

F. I. N. T. COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 04 October 2000 (04.10.00)	
International application No. PCT/JP00/00567	Applicant's or agent's file reference H1-007PCT
International filing date (day/month/year) 02 February 2000 (02.02.00)	Priority date (day/month/year) 02 February 1999 (02.02.99)
Applicant WAKAO, Rika	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

25 August 2000 (25.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kiwa Mpay Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6f.
1-1-1 Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 21 September 2001 (21.09.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference H1-007PCT	
International application No. PCT/JP00/00567	International filing date (day/month/year) 02 February 2000 (02.02.00)

1. The following indications appeared on record concerning:	
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address WAKAO, Hiroshi 5-29-6, Hachimandai Kisarazu-shi, Chiba 292-0814 Japan (Applicant for all designated States except US)	State of Nationality JP
	State of Residence JP
	Telephone No.
	Facsimile No.
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:	
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address WAKAO, Hiroshi 5-29-6, Hachimandai Kisarazu-shi, Chiba 292-0814 Japan (Applicant for US only and Inventor for all designated States)	State of Nationality JP
	State of Residence JP
	Telephone No.
	Facsimile No.
3. Further observations, if necessary:	
4. A copy of this notification has been sent to:	
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Masashi HONDA
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 04 MAY 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 H1-007PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/00567	国際出願日 (日.月.年) 02.02.00	優先日 (日.月.年) 02.02.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl ¹ C12N5/00, C12N15/11, A61K38/22, A61P43/00, A61K45/00		
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ ~~PCT~~ 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 25.08.00	国際予備審査報告を作成した日 16.04.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 六笠 紀子	4B 9735
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-22	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

引用文献1: Connie A. Myers et al.

"Characterization of BCE-1, a transcriptional enhancer regulated by prolactin and extracellular matrix and modulated by the state of histone acetylation" Molecular and Cellular Biology (1998) Vol. 18, No. 4, p. 2184-2195

引用文献2: Zhang-Zhi Hu et al.

"Transcriptional regulation of the generic promoter III of the rat prolactin receptor gene by C/EBP β and Spl" The Journal of Biological Chemistry (1998) Vol. 273, No. 40, p. 26225-26235

引用文献3: Peter M. Spooner et al.

"Development of lipoprotein lipase activity and accumulation of triacylglycerol in differentiating 3T3-L1 adipocytes" The Journal of Biological Chemistry (1979) Vol. 254, No. 4, p. 1305-1311

引用文献4: Lehmann, J. M. et al.

"An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)" The Journal of Biomedical Science (1995) Vol. 270, No. 22, p. 12953-12956

引用文献5: Zhidan Wu et al.

"Conditional ectopic expression of C/EBP β in NIH-3T3 cells induces PPAR γ and stimulates adipogenesis" Genes & Development (1995) Vol. 9, p. 2350-2363

Ⅶ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

一般に、所望の性質を特定することのみで、その性質を有する化合物自体を把握することは困難であるため、化学構造等の有効成分を得るための手がかりが記載されていない明細書は、発明の実施に必要な有効成分の入手過程において、無数の化合物を製造、スクリーニングして、当該性質を有するか否かを確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものであり、当業者が発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されていないものと判断される。

これを本願明細書についてみると、請求の範囲 18 に記載の「脂肪細胞分化阻害剤または脂肪細胞分化促進剤」を識別するためのスクリーニング方法は記載されているものの、有効成分を得るための化学構造等の手がかりが記載されておらず、かつ、それが出願時に当業者に推認できたものとも認められないので、請求項に包含される有効成分を当業者が理解できず、発明の実施に当たり、無数の化合物を製造、スクリーニングして確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものである。

したがって、発明の詳細の説明は、請求の範囲 18 に係る発明を当業者が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

請求項 14 乃至 17 についても同様である。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

請求の範囲: 1-4、19-21

引用文献1には、プロラクチンにより制御される転写活性因子であるBCE-1について、この因子がC/EBP β と結合する領域をもつことが記載されている。

引用文献2には、C/EBP β の結合が、PIIIを介することで、プロラクチンレセプター遺伝子を制御していることが記載されている。

引用文献3には、フィブロブラストである3T3細胞から脂肪細胞への分化の過程でプロラクチン処理によりリポプロテインリパーゼ活性を上昇させること、該酵素活性の上昇が脂肪細胞の分化に関与することが示唆されている。

引用文献4には、PPAR γ のフィibroブラストでの発現が脂肪細胞分化に関与することが記載されている。

引用文献5には、フィibroブラストNIH-3T3においてC/EBP β を過剰発現すると、PPAR γ のmRNAの発現を誘導することが記載されている。

ここで、引用文献1及び2の記載から、プロラクチンの存在下でBCE-1を介してC/EBPが活性化されてプロラクチン受容体の発現が誘導されること、引用文献1乃至5の記載から、プロラクチンによるフィibroブラストの脂肪細胞分化の過程において、プロラクチンによりC/EBPが活性化され、PPAR γ を誘導することにより脂肪細胞分化を惹起することは当業者が容易に想到し得たものと認められるから、請求の範囲1乃至4及び19乃至21に係る発明は引用文献1乃至5の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

請求の範囲: 5-18

上述したようにプロラクチンが脂肪細胞分化に関与していることが示されたので、プロラクチン、及びプロラクチン受容体を用いた系により脂肪細胞の分化阻害剤または促進剤をスクリーニングすることは当業者が容易に想到し得たものと認める。

従って、請求の範囲5乃至18に係る発明は引用文献1乃至5の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

請求の範囲: 22

引用文献4には、チアゾリジンジオンがPPAR γ の活性化剤として記載されている。

従って、請求の範囲22に係る発明は引用文献1乃至5の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

P C T

E P



国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[PCT 18 条、PCT 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 H1-007PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/00567	国際出願日 (日.月.年) 02.02.00	優先日 (日.月.年) 02.02.99
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18 条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 5/00, C12N 15/11, A61K 38/22, A61P 43/00, A61K 45/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 5/00, C12N 15/11, A61K 38/22, A61P 43/00, A61K 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Connie A. Myers et al., "Characterization of BCE-1, a transcriptional enhancer regulated by prolactin and extracellular matrix and modulated by the state of histone acetylation", Molecular and Cellular Biology(1998), Vol. 18, No. 4, p. 2184-2195	1-22
Y	Zhang-Zhi Hu et al., "Transcriptional regulation of the generic promoter III of the rat prolactin receptor gene by C/EBP β and Sp1", The Journal of Biological Chemistry(1998), Vol. 273, No. 40, p. 26225-26235	1-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.04.00

国際調査報告の発送日

8.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子



4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Peter M. Spooner et al., "Development of lipoprotein lipase activity and accumulation of triacylglycerol in differentiating 3T3-L1 adipocytes", The Journal of Biological Chemistry(1979) , Vol.254 , No.4 , p.1305-1311	1 - 2 2
Y	Lehmann, J.M. et al., "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)", The Journal of Biomedical Science(1995) , Vol.270 , No.22 , p.12953-12956	1 - 2 2
Y	Zhidan Wu et al., "Conditional ectopic expression of C/EBP β in NIH-3T3 cells induces PPAR γ and stimulates adipogenesis", Genes & Development(1995) , Vol.9 , p.2350-2363	1 - 2 2



(51) 国際特許分類7 C12N 5/00, 15/11, A61K 38/22, A61P 43/00, A61K 45/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/46348 (43) 国際公開日 2000年8月10日(10.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00567 (22) 国際出願日 2000年2月2日(02.02.00) (30) 優先権データ 特願平11/24625 1999年2月2日(02.02.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3 Chiba, (JP) 若尾 宏(WAKAO, Hiroshi)[JP/JP] 〒292-0814 千葉県木更津市八幡台5-29-6 Chiba, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 若尾 리카(WAKAO, Rika)[JP/JP] 〒292-0814 千葉県木更津市八幡台5-29-6 Chiba, (JP) (74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION INTO ADIPOCYTES, COMPOUND REGULATING DIFFERENTIATION INTO ADIPOCYTES AND METHOD FOR SCREENING THE SAME (54) 発明の名称 脂肪細胞への分化を誘導する方法、並びに脂肪細胞への分化を制御する化合物およびそのスクリーニング方法 (57) Abstract It has been found out that prolactin, which is one of the components of fetal bovine serum (FBS), is capable of inducing the expression of C/EBP β gene and PPAr γ gene in multipotential mesenchyme stem cells and thus differentiating these cells into adipocytes. It has been further found out that a compound regulating the differentiation into adipocytes can be screened by using an adipocyte differentiation system with the use of prolactin.		

(57)要約

ウシ胎児血清 (FBS) の成分の一つであるプロラクチンが、多能性間葉系幹細胞において、C/EBP β 遺伝子および PPAR γ 遺伝子の発現を誘導し、該細胞を脂肪細胞へ分化させる能力を有することを見出した。さらに、プロラクチンを用いた脂肪細胞の分化系を利用して、脂肪細胞の分化を制御する化合物のスクリーニングを行い得ることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明細書

脂肪細胞への分化を誘導する方法、並びに脂肪細胞への分化を制御する化合物

およびそのスクリーニング方法

技術分野

本発明は、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導する方法、並びに脂肪細胞の分化を促進または阻害する化合物およびそれらのスクリーニング方法に関する。

背景技術

脂肪細胞は生体におけるエネルギー代謝の調節において重要な役割を果たしており、肥満や糖尿病などの疾患には脂肪細胞の異常が深く関わっていることが知られている。脂肪細胞は、多能性間葉系幹細胞 (multipotential mesenchmal stem cells) と呼ばれる一群の細胞から分化する。

多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への変換は、細胞増殖の停止、形態変化、および分化による遺伝子発現の変化を伴っている (O.A. MacDougald and M.D. Lane (1995) Annu. Rev. Biochem. 64: 345-373; L. Fajas et al. (1998) Curr. Opin. Cell Biol. 10: 165-173)。3T3-L1 や 3T3-F422A 細胞などの脂肪前駆細胞株を用いることによって、脂肪細胞への分化に重要ないくつかの遺伝子がこれまでに解明されてきた。これらは C/EBP ファミリーや ADD-1 などの転写因子、核内ホルモンレセプターである PPAR γ などで、脂肪細胞への分化過程のある一定時期に発現され、脂肪細胞特異的遺伝子の発現を促進したり抑制したりすることで分化の制御を行っている。

C/EBP ファミリータンパク質は構造が共通しており、C 末端領域にダイマー形成

のためのロイシンジッパー (leucine zipper) と DNA 結合のための塩基性残基を有する。C/EBP ファミリーの中で、C/EBP α 、 β 、 δ 、および CHOP (Gadd153) は脂肪細胞成熟(adipogenesis)に関与していることが知られている (F.T. Lin and M.D. Lane (1992) *Genes Dev.* 6: 533-544; S.O. Freytag et al., (1994) *Genes Dev.* 8: 1654-1663; F.T. Lin and M.D. Lane (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8757-8761; W.C. Yeh et al. (1995) *Genes Dev.* 9: 168-181; N. Batchvarova et al. (1995) *EMBO J.* 14: 4654-4661)。C/EBP β および C/EBP δ mRNA は 3T3-L1 細胞分化の初期において発現が誘導されるが、C/EBP α は分化の比較的後期に発現が誘導される (Z. Cao et al. (1991) *Genes Dev.* 5: 1538-1552)。PPAR γ および ADD-1 は、細胞の分化が進むにつれて発現が増加する (Tontonoz et al., 1994, *Cell*, 79 1147-1156; J.B. Kim and B.M. Spiegelman (1996) *Genes Dev.* 10: 1096-1107)。これら C/EBP ファミリーのうち 1 つを異所的に発現させると、脂肪前駆細胞や多能性間葉系幹細胞は脂肪細胞へ変換されることから、C/EBP ファミリーは脂肪細胞への分化の重要な制御因子であると考えられる。例えば C/EBP β を多能性間葉系幹細胞において異所的に発現させると脂肪細胞への変換が引き起こされる。C/EBP δ の異所的な発現でも、活性は弱いですが、同様の効果がある (Yeh et al. (1995) *Genes Dev.* 9: 168-181)。また、C/EBP β のドミナントネガティブ (優勢抑制) 変異体を過剰発現させると、3T3-L1 細胞の分化が阻害される (Yeh et al. (1995) *Genes Dev.* 9: 168-181)。C/EBP α も脂肪細胞分化に重要な役割を果たしており、C/EBP α のアンチセンス RNA の細胞内導入により 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化が遮断される (F.T. Lin and M.D. Lane (1992) *Genes Dev.* 6: 533-544)。また反対に C/EBP α を多能性間葉系幹細胞に強発現させることにより、脂肪細胞分化誘導ホルモンの非存在下でも脂肪細胞へ分化させることができる (S.O. Freytag et al., (1994) *Genes Dev.* 8: 1654-1663; F.T. Lin and M.D. Lane (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8757-8761)。CHOP (Gadd153) は C/EBP α や C/EBP β と強くダイマーを形成し、これらの C/EBP タンパク質が DNA へ結合するのを阻

害する (D. Ron and J.F. Habener (1992) *Genes Dev.* 6: 439-453)。その結果、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化は阻害される (N. Batchvarova et al. (1995) *EMBO J.* 14: 4654-4661)。

C/EBP α を欠損させたマウスは、褐色脂肪細胞 (brown adipose tissue; BAT) および白色脂肪細胞 (white adipose tissue; WAT) が顕著に減少している (N.D. Wang et al. (1995) *Science* 269: 1108-1112)。また C/EBP β または δ を欠損させたマウスは、胎児繊維芽細胞初代培養の脂肪細胞への分化を弱く阻害し、精巢上体の WAT の体積をわずかに減少させる (T. Tanaka et al. (1997) *EMBO J.* 16: 7432-7443)。これに対して C/EBP β および δ の二重ノックアウトマウスでは脂肪細胞への分化が顕著に阻害され、脂肪細胞の減少により WAT 重量の深刻な減少が引き起こされる (T. Tanaka et al. (1997) *EMBO J.* 16: 7432-7443)。

PPAR γ はリガンドにより活性化される核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属する転写因子である (S.A. Kliewer et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7355-7359; D.J. Mangelsdorf et al. (1995) *Cell* 83: 835-839)。この遺伝子の発現は脂肪組織で極めて高いが、それ以外でも発現が認められる。多能性間葉系幹細胞において PPAR γ を強制的に発現させると、PPAR γ のリガンド/アゴニストであるチアゾリジンジオン、またはプロスタグランジン存在下で脂肪細胞への分化が引き起こされる (Tontonoz et al., 1994 *Cell*, 79 1147-1156; B.M. Forman et al. (1995) *Cell* 83: 803-812; S.A. Kliewer et al. (1995) *Cell* 83: 813-819)。脂肪細胞においては、PPAR γ は脂肪細胞の分化に関連する遺伝子である 422/aP2、ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK)、およびリポ蛋白質リパーゼ (LPL) 等を活性化する。実際、これらの遺伝子のプロモーターには、PPAR γ 結合部位が含まれている (Tontonoz et al., 1994 *Genes and Dev.* 8, 1224-1234; K. Schoonjans et al. (1996) *EMBO J.* 15: 5336-5348)。これらの実験から、PPAR γ は脂肪細胞成熟にとって鍵となる遺伝子であることが判明している。また最近、PPAR γ が炎症反応の制御やマクロファージの分化にも関与し

ていることが明らかにされた (M. Ricote et al. (1998) *Nature* 391: 79-82; C. Jiang et al. (1998) *Nature* 391: 82-86; L. Nagy et al. (1998) *Cell* 93: 229-240; P. Tontonoz et al. (1998) *Cell* 93: 241-252)。

ADD-1 は異なるファミリーに属する転写因子であり、塩基性に富んだアミノ酸残基-ヘリックス-ループ-ヘリックス-ロイシンジッパーモチーフを有する (P. Tontonoz et al. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13: 4753-4759)。脂肪前駆細胞 3T3-L1 の脂肪細胞への分化における ADD-1 の発現パターンは PPAR γ とよく似ている。PPAR γ の場合と同様、多能性間葉系幹細胞において ADD-1 は異所的に高発現させると、PPAR γ 活性化因子存在下で多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる (J.B. Kim and B.M. Spiegelman (1996) *Genes Dev.* 10: 1096-1107)。また興味深いことに、ADD-1 のヒトホモログであるステロール制御配列結合タンパク質 (SREBP1) は、コレステロール代謝に関連する遺伝子の制御に関与している (C. Yokoyama et al. (1993) *Cell* 75: 187-197)。

前述のように、これらの転写因子は脂肪細胞分化に重要な役割を果たしていることが知られているが、これらの遺伝子の発現や機能は脂肪組織および/または脂肪細胞の分化に限られたものではない。また、脂肪前駆細胞の分化の初期において、細胞がどのように脂肪細胞へと分化することが決定 (コミット) されるのかについてもほとんど知られていない。

脂肪前駆細胞 3T3-L1 を脂肪細胞へ分化させるためには、ウシ胎児血清 (FBS)、メチルイソブチルキサンチン (methyrisobutylxanthine; MIX)、デキサメタゾン (dexamethasone; DEX)、およびインスリンなどの脂肪細胞分化誘導ホルモン (adipogenic hormones) が必要である。このうち MIX は C/EBP β および δ を誘導し、DEX は C/EBP δ を誘導することが知られている (Z. Cao et al. (1991) *Genes Dev.* 5: 1538-1552) が、脂肪細胞への分化 (adipogenesis) の初期における PPAR γ の発現制御に関しては、ほとんど知られていない。

PPAR γ mRNA の発現がどのように制御されるのかについては、C/EBP β の上昇が

PPAR γ の発現に重要である可能性が考えられる (Z. Wu et al. (1996) Mol. Cell. Biol. 16: 4128-4136; Z. Wu et al. (1995) Genes Dev. 9: 2350-2363) もの、*in vivo* の実験からは、PPAR γ 発現は C/EBP β にはほとんど依存していないことが示唆されている (T. Tanaka et al. (1997) EMBO J. 16: 7432-7443)。PPAR γ の発現誘導を含めた脂肪細胞分化決定の分子制御機構を解明することが求められていた。

発明の開示

本発明は、脂肪細胞の分化制御機構を解明し、これにより脂肪細胞の分化を誘導するための新たな方法、並びに脂肪細胞への分化を促進または阻害する化合物およびそれらのスクリーニング方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、脂肪細胞への分化の重要な制御因子であることが知られている C/EBP ファミリー遺伝子および脂肪細胞への分化の鍵となる遺伝子であると考えられている PPAR γ 遺伝子の発現を誘導する因子の探索を行い、その結果、ウシ胎児血清 (FBS) の成分の一つであるプロラクチンが、少なくとも多能性間葉系幹細胞において、C/EBP β 遺伝子および PPAR γ 遺伝子の転写を誘導することを見出した。

また、本発明者らは、実際に、プロラクチンが強い許容培養条件下 (即ち、PPAR γ リガンド/アゴニストの存在下) で多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる能力を有することを見出した。

さらに、本発明者らは、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化におけるプロラクチン受容体の関与を検討した結果、プロラクチン受容体が、プロラクチンおよび PPAR γ 活性化因子の存在下において多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を高い効率で誘導することを見出した。

即ち、本発明者らは、プロラクチンおよび PPAR γ によるシグナルが協調して、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導していることを初めて実証するこ

とに成功した。

さらに、本発明者らは、プロラクチンを用いた上記脂肪細胞の分化系を利用して、また、脂肪細胞分化のシグナルの伝達に関連する上記因子を標的として、脂肪細胞の分化を制御する化合物のスクリーニングを行い得ることを見出した。

従って、本発明は、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導する方法、並びに脂肪細胞への分化を促進または阻害する化合物およびそれらのスクリーニング方法に関し、より具体的には、

(1) 多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる方法であって、プロラクチンまたはその同効物の共存下で多能性間葉系幹細胞を培養する工程を含む方法、

(2) さらに、PPAR γ 活性化剤が共存している、(1)に記載の方法、

(3) 多能性間葉系幹細胞が外来性のプロラクチン受容体を発現している、
(1)または(2)に記載の方法、

(4) 多能性間葉系幹細胞が NIH-3T3 細胞である、(1)～(3)のいずれかに記載の方法、

(5) 脂肪細胞の分化阻害剤または促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料、およびプロラクチンまたはその同効物の共存下、多能性間葉系幹細胞を培養する工程、

(b) 該細胞の脂肪細胞への分化を検出する工程、および

(c) 被検試料非共存下(対照)における場合と比べ、該変化を阻害または促進する化合物を選択する工程、を含む方法、

(6) さらに、PPAR γ 活性化剤が共存している、(5)に記載の方法、

(7) 多能性間葉系幹細胞が外来性のプロラクチン受容体を発現している、
(5)または(6)に記載の方法、

(8) 脂肪細胞への分化を、細胞質中の脂肪の蓄積、脂肪細胞への分化を誘導する遺伝子の発現、または脂肪細胞のマーカー遺伝子の発現を指標として検出

する、(5) から (7) のいずれかに記載の方法、

(9) 多能性間葉系幹細胞が NIH-3T3 細胞である、(5) ~ (8) のいずれかに記載の方法、

(10) 脂肪細胞への分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) プロラクチンと被検試料とを接触させる工程、および

(b) プロラクチンに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(11) 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) プロラクチン受容体と被検試料とを接触させる工程、および

(b) プロラクチン受容体に結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(12) 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下でプロラクチンとプロラクチン受容体とを接触させる工程、および

(b) プロラクチンとプロラクチン受容体との結合を阻害または促進する化合物を選択する工程、を含む方法、

(13) 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) 内在性プロラクチン受容体を発現する細胞であって、かつプロラクチンに応答して活性化するプロモーターおよびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞を提供する工程、

(b) 該細胞に対し、被検試料、または被検試料およびプロラクチンを接触させる工程、および

(c) 該細胞におけるレポーター活性を検出する工程、を含む方法、

(14) プロラクチン阻害剤を有効成分とする、脂肪細胞分化阻害剤、

- (15) プロラクチン受容体阻害剤を有効成分とする、脂肪細胞分化阻害剤、
- (16) プロラクチン活性化剤を有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤、
- (17) プロラクチン受容体活性化剤を有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤、
- (18) (5) から (13) のいずれかに記載の方法により単離しうる、脂肪細胞分化阻害剤または脂肪細胞分化促進剤、
- (19) プロラクチンを有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤、
- (20) プロラクチンを有効成分とする、PPAR γ の発現誘導剤、
- (21) プロラクチンを有効成分とする、C/EBP β の発現誘導剤、
- (22) プロラクチンの細胞内シグナル伝達を阻害もしくは亢進する化合物であって、脂肪細胞分化を阻害または促進する化合物、に関する。

なお、本発明において「多能性間葉系幹細胞」とは、胚において単独で存在（単細胞）して機能し、軟骨、筋、脂肪細胞に分化する能力を有する細胞を指す。また、本発明において「脂肪細胞」とは、脂肪組織を構成する主な細胞で、内部に脂肪を含んでおり、体内エネルギーの貯蔵(lipogenesis)と動員(lipolysis)を行う細胞を指す。また、「脂肪細胞への分化」には、完全な分化のみならず、脂肪細胞への分化の誘導に伴う諸変化も含まれる。

本発明において、プロラクチンが多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導する能力を有することが見出された。従って、本発明は、第一に、プロラクチンの共存下で多能性間葉系幹細胞を培養する工程を含む多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる方法に関する。本発明の方法において用いられるプロラクチンとしては、天然由来のプロラクチンの他、遺伝子組換え技術により調製した組み換えプロラクチンを用いることも可能であり、また、市販のものを用いることも可能である（例えば、Sigma社から販売されている）。また、多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる能力を有する限り、天然型のプロラクチン以外に、その変異体や部分ペプチドを用いることも可能である。

また、本発明において、プロラクチン受容体の活性化により多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化が誘導されることが見出された。従って、本発明の方法においては、プロラクチン受容体を活性化する能力を有するプロラクチンの同効物を用いることが可能である。ここで「プロラクチンの同効物」とはプロラクチン同様にプロラクチン受容体を活性化し細胞内に信号を伝達する能力を有する化合物を指す。このような化合物には、例えば、胎盤性ラクトゲン (placental lactogen) (Cohick et al., Mol. Cell. Endocrinol. 1996, 116, 49-58) が含まれる。

本発明の方法において用いられる多能性間葉系幹細胞としては、好ましくは、NIH-3T3 細胞であるが、BALB/c3T3、Swiss3T3 などとも使用可能と考えられる。本実施例において多能性間葉系幹細胞にプロラクチン受容体を高発現させ、プロラクチンを作用させると、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化効率が上昇を示した。従って、本発明の方法において用いられる多能性間葉系幹細胞は、プロラクチン受容体を高発現していることが好ましい。細胞におけるプロラクチン受容体の発現レベルは、例えば、プロラクチン受容体遺伝子を外来的に導入することにより引き上げることが可能である。具体的には、例えば実施例に示すように、プロラクチン受容体をコードする cDNA を含む発現ベクターを細胞に導入することができる。発現レベルは、用いるプロモーターや導入する遺伝子のコピー数などにより適宜調節することが可能である。

プロラクチン受容体遺伝子は、当業者に公知の方法、例えば、その塩基配列情報に基づき作製したプライマーを用いて、プロラクチン受容体が発現している細胞や組織 (例えば肝臓など) 由来の cDNA ライブラリーのスクリーニングなどの方法で単離することが可能である。

該遺伝子を多能性間葉系幹細胞内で発現させるための発現ベクターとしては、例えば pME18S ベクター (Mol. Cell. Biol. 8:466~472(1988))、CMV promoter をもつ発現ベクターなど、動物細胞で発現可能なすべてのベクターを用いること

ができる。ベクターへの cDNA の挿入は常法により制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。多能性間葉系幹細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製)、マイクロインジェクション法などの方法で行うことが可能であるが、レトロウイルスを用いた方法も可能である (Pear et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8392-8396, 1993)。

脂肪細胞への分化のための多能性間葉系幹細胞の培養は、例えば、実施例に記載の方法により行うことができる。

多能性間葉系幹細胞の増殖培地としては、一般的に、ウシ血清 (Calf serum) を添加した DMEM 培地が用いられる。また、分化培地には、DEX、MIX、インスリン、およびウシ胎児血清 (FBS) などの脂肪細胞分化誘導ホルモンを添加した DMEM 培地が用いられる。多能性間葉系幹細胞は血清要求性が非常に高いため、培養においては、二日に一度程度、培地を交換することが好ましい。

本実施例において、培地に、プロラクチンに加えて、PPAR γ の活性化剤を添加すると脂肪細胞への分化の効率を有意に高めることができることが示された。従って、多能性間葉系幹細胞の培養培地は、好ましくは PPAR γ の活性化剤を含有する。培養においては、PPAR γ 活性化剤は、PPAR γ の発現のピークとなる時期に添加すると好ましい (例えば、本実施例における脂肪細胞分化誘導刺激から 48 時間経過後)。PPAR γ の活性化剤としては、例えば、トログリタゾン、エングリタゾン、ピオグリタゾンなどのチアゾリジンジオン (Thiazolidinedione) や ETYA、BRL49653、15 deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 などが挙げられる。

また、本発明において、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化にプロラクチン-プロラクチン受容体を介したシグナル伝達が関与していることが見出された。

このプロラクチン-プロラクチン受容体を介したシグナル伝達を阻害または促進することにより、脂肪細胞の分化を阻害または促進することができると考えられる。従って、本発明は、また、プロラクチン-プロラクチン受容体を介したシグナル伝達を阻害または促進する化合物を有効成分とする、脂肪細胞の分化の阻害剤および促進剤に関する。本発明の脂肪細胞の分化の阻害剤または促進剤には、例えば、プロラクチン、プロラクチン活性化剤、またはプロラクチン受容体活性化剤を有効成分とする脂肪細胞分化促進剤、並びにプロラクチンシグナル伝達阻害剤またはプロラクチン受容体阻害剤を有効成分とする、脂肪細胞分化阻害剤を含有する。

このような阻害剤や促進剤は、例えば、上記の多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる系を利用してスクリーニングすることができる。即ち、上記の多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる系に被検試料を添加し、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化効率を検出することによりスクリーニングすることができる。このスクリーニング方法は、具体的には、(a) 被検試料、およびプロラクチンまたはその同効物の共存下、多能性間葉系幹細胞を培養する工程、(b) 該細胞の脂肪細胞への分化を検出する工程、および(c) 被検試料非共存下(対照)における場合と比べ、該変化を阻害または増強する化合物を選択する工程、を含む。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質(抗体を含む)、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、リボザイム、アンチセンス核酸などが挙げられるが、これらに制限されない。

例えば、被検試料として抗体を用いる場合、その形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。抗体の作製は、常法に従って行うことができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons.

Section 11.12~11.13; Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11; 「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156」; Methods in Enzymology 203, 99-121(1991))。

被検試料としてタンパク質や RNA を用いる場合、直接細胞へ作用させるのではなく、これらをコードする cDNA を、後述のプロラクチン受容体 cDNA の場合と同様の方法を用いて発現ベクターに組み込み、細胞へ導入することによって、細胞内でこれらの被検試料を生産させることも可能である。

このスクリーニングは、具体的には、例えば、被検試料の存在下、実施例 1 から 3 に記載されたように、プロラクチンを含む培地で多能性間葉系幹細胞をインキュベートし、該細胞の脂肪細胞への分化を検出することにより実施することができる。多能性間葉系幹細胞としては、実施例 4 に記載のように、プロラクチン受容体を高発現する多能性間葉系幹細胞を用いることができる。また、この細胞に被検試料を作用させる（被検試料となる cDNA を導入することも含む）ことによってその被検試料がプロラクチンもしくはプロラクチン受容体と共同で脂肪細胞への分化をより促進するか否かの機能評価が可能となる。また逆にプロラクチンもしくはプロラクチン受容体による多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を阻害するか否かも同様の実験によって検証可能となる。

本発明のスクリーニング方法における多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化の検証は、例えば、細胞質における脂肪の蓄積すなわち脂肪滴の形成、細胞の形態変化(未分化では繊維状の形態であるが分化が進んでくると丸みを帯びてくる)などの脂肪細胞としての表現型を検出することにより行うことができる。検出は、顕微鏡を用いた観察により行うことができる。さらに観察された滴が脂肪を含有しているか否か細胞をフォルムアルデヒドなどで固定後 Oil-Red-O 試薬で染色して調べる。脂肪酸、中性脂肪、コレステロールエステルなどは濃赤色に染まるが

リン脂質やセレブレシドは淡赤色に染まる。また、分子生物学的に脂肪細胞のマーカ遺伝子や脂肪細胞への分化を誘導する遺伝子の発現を指標として検証することも可能である。脂肪細胞のマーカ遺伝子としては、例えば、aP2、GPD、Adipsin (Cook et al., 1987 Science 237, 402-5)、leptin (MacDougald et al., 1995 Proc Natl Acad Sci U S , 92, 9034-7) などが挙げられる。脂肪細胞への分化を誘導する遺伝子としては、例えば、PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP δ 、C/EBP α 、ADD-1 などが挙げられる。これら遺伝子の発現の検出は、転写レベルであればノーザンブロット法、RNase プロテクション法により解析することができる (Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory)。また、翻訳レベルであれば、ウエスタンブロット、免疫沈降法により解析することができる。

このような多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化の検出の結果、被検試料の添加により有意な脂肪細胞への分化の阻害が検出されれば、該被検試料は脂肪細胞分化阻害剤の候補であると判定され、一方、脂肪細胞への分化の促進が検出されれば、該被検試料は脂肪細胞分化促進剤の候補であると判定される。本発明の促進剤としては、細胞を脂肪細胞へ完全に変換できなくても、該促進剤を添加しない場合に比べ、脂肪細胞への変換が有意に促進されればよい。また本発明の阻害剤としては、脂肪細胞への変換を完全には阻害できなくても、該阻害剤を添加しない場合に比べ、脂肪細胞への変換が有意に阻害されればよい。

このスクリーニングにより単離される化合物には、プロラクチンやプロラクチン受容体に直接作用するもの（例えば、プロラクチン受容体に作用しプロラクチンからのシグナル伝達を阻害するものやプロラクチン受容体に作用しプロラクチンと同様の効果を示すもの(プロラクチン受容体のアゴニストやアンタゴニスト)、プロラクチンに作用してそのプロラクチン受容体への結合を促進または阻害するものなど）の他、プロラクチン-プロラクチン受容体を介する脂肪細胞分化の細胞内シグナル伝達経路において、プロラクチン受容体の下流で作用するものが含まれる。

また、本発明の脂肪細胞の分化促進剤または分化阻害剤のスクリーニングは、プロラクチンおよび／またはプロラクチン受容体を直接標的として行うこともできる。このスクリーニング方法の一つの態様は、プロラクチンを標的とするものであり、(a) プロラクチンと被検試料とを接触させる工程、および (b) プロラクチンに結合する化合物を選択する工程、を含む方法である。また、このスクリーニングの他の態様としては、プロラクチン受容体を標的とするものであり、(a) プロラクチン受容体と被検試料とを接触させる工程、および (b) プロラクチン受容体に結合する化合物を選択する工程、を含む方法である。

また、このスクリーニングの他の態様としては、プロラクチンおよびプロラクチン受容体を標的とするものであり、(a) 被検試料の存在下でプロラクチンとプロラクチン受容体とを接触させる工程、および (b) プロラクチンとプロラクチン受容体との結合を阻害または促進する化合物を選択する工程、を含む方法である。

用いるプロラクチン受容体は、精製タンパク質であっても、膜画分として存在していても、また、細胞表面に発現させたものであってもよい。例えば、プロラクチン受容体を強発現させた多能性間葉系幹細胞を被検試料およびプロラクチンの存在下で培養し、プロラクチンとプロラクチン受容体との結合の阻害または促進を、脂肪細胞への分化を指標に検出することによりスクリーニングを実施することができる。

また、本発明の脂肪細胞の分化促進剤または分化阻害剤のスクリーニングは、レポーターシステムを用いた方法で行うことも可能である。この方法は、(a) 内在性プロラクチン受容体を発現する細胞であって、プロラクチンに応答して活性化するプロモーターおよびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞を提供する工程、(b) 該細胞に対し、被検試料または被検試料およびプロラクチンを接触させる工程、(c) 該細胞におけるレポーター活性を検出する工程、を含む。

プロラクチンに応答して活性化するプロモーターとしては、これに制限されないが、例えば、カゼイン(casein)プロモーター (Wakao, H. et al., EMBO J, 1994, 13: 2182-2191) が挙げられる。また、レポーター遺伝子としては、これに制限されないが、ホタルルシフェラーゼ(firefly luciferase)遺伝子(Wakao, H. et al., EMBO J, 1994, 13: 2182-2191) が挙げられる。上記プロモーターの下流に結合したレポーター遺伝子を含むベクターの構築は、当業者に公知の遺伝子組換え技術により行うことができる。

また、上記ベクターを導入する細胞としては、内在性のプロラクチン受容体を発現している細胞であれば特に制限はなく、例えば、CHO (Chinese hamster ovary) 細胞が挙げられる。

このスクリーニングにおいて、レポーター活性の上昇または低下が検出されれば、用いた被検試料はそれぞれ脂肪細胞分化の促進剤または阻害剤の候補となる。

本発明のスクリーニングにより得られた化合物は、プロラクチン-プロラクチン受容体を介するシグナル伝達を制御することにより脂肪細胞への分化を促進または阻害する化合物の候補となる。得られた化合物が実際に脂肪細胞の分化を制御するか否かは、上記した本発明の多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる系にこれら化合物を適用し、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を検出することにより判定することができる。

本発明のスクリーニングにより得られた脂肪細胞の分化を阻害または促進する活性を有する化合物には、種々の医療上の応用が考えられる。例えば、分化促進剤は、ノスカル (Thiazolidinedione) などのインシュリン抵抗性糖尿病改善薬との併用によるインシュリン抵抗性のさらなる改善が期待される。Thiazolidinedione 群薬剤によるインシュリン抵抗性解除の生体内での分子機構は未だ完全に解明されていないが、3T3L-1 細胞において TNF- α によるインスリン作用の阻害を解除するという報告がある (Szalkowski D et al. Endocrinology 136: 1474-1481, 1995)。また、Thiazolidinedione 群薬剤は脂肪前駆細胞から脂

脂肪細胞への分化を促進し、インスリン抵抗性を惹起する肥大した脂肪細胞の数を減らし、インスリン感受性を亢進させる小型の良性脂肪細胞の数を増やすという説がある(Okuno A et al. J.Clin. Invest.101(6):1354-61,1998)。

また、本実施例において、プロラクチンが、多能性間葉系幹細胞において C/EBP β 遺伝子および PPAR γ 遺伝子の発現を誘導することを見出された。従って、本発明は、また、プロラクチンを有効成分とする、PPAR γ の発現誘導剤および C/EBP β の発現誘導剤を包含する。

脂肪細胞の分化を制御し得る上記化合物を医薬品として用いる場合には、これらの化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせ、製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。また、脂肪細胞の分化を制御し得る上記化合物は、様々な実験において脂肪細胞の分化を制御するための試薬として用いることも可能である。

図面の簡単な説明

図 1 は、さまざまなエフェクターによる、3T3-L1 細胞 (A) および NIH-3T3 細胞 (B) における C/EBP β mRNA の誘導を示す図である。

コンフルエントに達した細胞を、下記の異なるエフェクターを含む 10%ウシ血清 (CS) 含有 DMEM (レーン 1~8)、または 10%FBS (ウシ胎児血清) 含有 DMEM (レーン 9) で 3 時間培養した。細胞から全 RNA を調製し、ノーザンブロットハイブリダイゼーションにより C/EBP β の発現を調べた。各レーンには等量(8 μ g/レーン)

ン)の RNA を泳動し、リボソーム RNA の染色によりそれを確認した。レーン 1 はエフェクターなし、レーン 2~5 はそれぞれ 37ng/ml、111ng/ml、333ng/ml、および 1 μ g/ml のプロラクチン、レーン 6 (M) は 0.5mM MIX、レーン 7 (D) は 1 μ M DEX、レーン 8 (I) は 10 μ g/ml インスリンを加えた結果を表す。

図 2 は、3T3-L1 細胞 (A) および NIH-3T3 細胞 (B) における、プロラクチンの用量依存的な PPAR γ mRNA の誘導を示す図である。

コンフルエントに達した細胞を 10%ウシ血清 (CS)、インスリン、DEX、および MIX を含む DMEM に、プロラクチンを用量を増やしながら加え、48 時間培養した (レーン 1~5)。対照として、コンフルエントに達した細胞を 10%FBS、インスリン、DEX、および MIX を含む DMEM で培養した (レーン 6)。等量の全 RNA (4 μ g/レーン) のノーザンブロット解析により PPAR γ mRNA を調べた。レーン 1 はプロラクチンなし、レーン 2~5 はそれぞれ 37ng/ml、111ng/ml、333ng/ml、および 1 μ g/ml のプロラクチンを加えた場合の結果を示す。

図 3 は、NIH-3T3 細胞の脂肪細胞分化プログラムにおけるプロラクチンの効果を示す図である。

コンフルエントに達した細胞を、10%FBS、インスリン、DEX、および MIX を含む DMEM において、1 μ g/ml のプロラクチン存在下 (P) または非存在下 (None) で 48 時間培養し、その後 5 μ M トログリタゾン、2.5 μ g/ml インスリン、および 10% FBS を含む DMEM において、1 μ g/ml のプロラクチン存在下 (P) または非存在下 (None) で培養した。分化誘導後、図示した日数 (days) に全 RNA を単離し、各レーンに等量 (3 μ g) の RNA を泳動しノーザンブロットハイブリダイゼーションにより図示した遺伝子の発現を解析した。

図 4 は、NIH-3T3 細胞にプロラクチン受容体を異所的に発現させた場合の、C/EBP β および PPAR γ mRNA 誘導の感受性の上昇を示す図である。

pSV2neo のみ (Neo)、またはプロラクチン受容体発現ベクターを pSV2neo と共に (PR)、NIH-3T3 細胞へトランスフェクションした。

(A) : コンフルエントに達した細胞を 10%ウシ血清 (CS) を含む DMEM にプロラクチンを、用量を増やしながら加え、3 時間培養した(レーン 1~5、6~10)。全 RNA を単離し、各レーンに等量(3 μ g)の RNA を泳動しノーザンブロットハイブリダイゼーションにより C/EBP β mRNA を解析した。レーン 1 および 6 はプロラクチンなし、レーン 2 および 7 は 37ng/ml のプロラクチン、レーン 3 および 8 は 111ng/ml のプロラクチン、レーン 4 および 9 は 333ng/ml のプロラクチン、レーン 5 および 10 は 1 μ g/ml のプロラクチンを加えた場合の結果を示す。

(B) : 10%ウシ血清 (CS)、インスリン、DEX、および MIX を含む DMEM にプロラクチンを、用量を増やしながら細胞に加え、48 時間培養した(レーン 1~5、6~10)。等量の全 RNA (2 μ g/レーン) のノーザンブロット解析により PPAR γ mRNA を調べた。プロラクチンの用量は (A) と同じとした。オートラジオグラムの露光時間は両 RNA で同じにした。

図 5 は、NIH-3T3 細胞の脂肪細胞への分化プログラムにおけるプロラクチン受容体の影響を示す図である。

安定にプロラクチン受容体遺伝子が導入された細胞群をコンフルエントに達するまで培養し、トログリタゾン存在下、プロラクチンなし (None) または 1 μ g/ml のプロラクチン (P) を含む FBS 分化培地で培養した。分化誘導後、図示した日数 (days) に全 RNA を単離し、各レーンに等量(3 μ g)の RNA を泳動しノーザンブロットハイブリダイゼーションにより脂肪細胞特異的遺伝子の発現を解析した。(A) はネオマイシン耐性遺伝子を安定に発現する細胞群、(B) はネオマイシン耐性遺伝子およびプロラクチン受容体遺伝子を安定に発現する細胞群の結果を示す。

図 6 は、ネオマイシン耐性遺伝子のみ (Neo) またはプロラクチン受容体を共に (Neo+PR) 発現する NIH-3T3 細胞群の顕微鏡写真である。

安定に遺伝子が導入された細胞をコンフルエントに達するまで培養し、1 μ g/ml のプロラクチン非存在下もしくは存在下 (+prolactin と表記) で、それぞれ強い許容条件で 10 日間培養した。その後細胞を固定し、Oil-Red-O で染色した。プロ

ラクチン受容体を発現する細胞では、形態が丸くなり、Oil-Red-O により赤く染色された細胞が観察された。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【参考例】 ノーザンブロット解析プローブ作製のための cDNA の単離

C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、PPAR γ 、aP2、および GPD cDNA を、ノーザンブロット解析のプローブに用いるため、分化誘導 9 日目に構築した 3T3-L1 脂肪細胞 cDNA ライブラリーより、以下に示した各遺伝子に対応する合成オリゴヌクレオチドを用いて単離した。

マウス C/EBP α , 5'-ATGGAGTCGGCCGACTTCTACGAGGCGGAG-3' (配列番号: 1)

マウス C/EBP β , 5'-ATGCACCGCCTGCTGGCCTGGGACGCAGCA-3' (配列番号: 2)

マウス C/EBP δ , 5'-ATGAGCGCCGCGCTTTTCAGCCTGGACAGC-3' (配列番号: 3)

マウス PPAR γ , 5'-ATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCC-3' (配列番号: 4)

マウス aP2, 5'-ATGTGTGATGCCTTTGTGGGAACCTGGAAG-3' (配列番号: 5)

マウス GPD, 5'-ATGGCGTTTCAAAGGCAGTGAAGGGGACT-3' (配列番号: 6)

各遺伝子を単離するため、上記合成オリゴヌクレオチドを DIG 標識して 3T3-L1 脂肪細胞 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによりポジティブクローンを得た。in vivo の切り出しにより lamda gt 22 phage に組み込まれた各クローンをプラスミド pZL1 のインサートとして取得した(Gibco BRL)。

【実施例 1】 多能性間葉系幹細胞 (NIH-3T3 細胞) および 3T3-L1 脂肪前駆細胞の C/EBP β mRNA の発現に及ぼすプロラクチンの影響

C/EBP β mRNA の発現は、MIX、Dex、インスリン、LPS、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-6、および成長ホルモンなどのさまざまな刺激により誘導されることが知られている (S. Akira et al. (1990) EMBO J. 9: 1897-1906; Z. Cao et al. (1991)

Genes Dev. 5 : 1538-1552; R.W. Clarkson et al. (1995) Mol. Endocrinol. 9: 108-120)。本発明者らは、プロラクチンが、3T3-L1 脂肪前駆細胞（国立衛生研究所細胞バンク, JCRB9014）や多能性間葉系幹細胞（NIH-3T3 細胞）（理研細胞バンク、カタログ番号 RCB0150）の C/EBP β mRNA の発現を誘導するかを検討した。

10%ウシ血清（CS）（GIBCO BRL 社製）を含む DMEM（日本生物研究所製）で培養しコンフルエントに達した細胞を、10%ウシ胎児血清（FBS）、あるいは下記に示すさまざまなエフェクター存在下もしくは非存在下でプロラクチン（Sigma 社）の量を変化（37ng/ml、111ng/ml、333ng/ml、および 1 μ g/ml）させて 3 時間作用させた。その後、全 RNA を文献「P. Chomczynski and N. Sacchi, 1987, Anal. Biochem. 162: 156-159」の方法に従って単離し、1%アガロース/2.2M ホルムアルデヒドゲル電気泳動後、ナイロンメンブランへ移した（T. Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press）。メチレンブルーで rRNA を染色（D.L. Herrin and G.W. Schmidt (1988) Biotechniques 6: 196-197, 199-200）し、RNA のトランスファー効率および量が均一であることを確認した。

Boehringer Mannheim 社（現 Roche Diagnostics 社）のプロトコールに従い、C/EBP β cDNA を含む pZL1 を EcoRI により直鎖化し、in vitro 転写により DIG ラベルされた RNA プローブを作製した。作製されたアンチセンス RNA プローブを用いて、添付のプロトコール（Boehringer Mannheim 社（現 Roche Diagnostics 社））に従いノーザンハイブリダイゼーションを行った。

その結果を図 1 A および B に示す。3T3-L1 細胞においては、プロラクチン依存的な C/EBP β mRNA の発現は観察されなかった（図 1 A、レーン 1~5）が、MIX (0.5 mM)（レーン 6）、Dex (1 μ M)（レーン 7）、およびインスリン (10 μ g/ml)（レーン 8）に関しては、既に報告されているように、単独で 3T3-L1 細胞における C/EBP β mRNA の発現を増強した。FBS は C/EBP β mRNA の発現を中程度に増強したが、MIX、DEX、またはインスリンに比べると効率は低かった（レーン 9）。また、プロ

ラクチン依存的な C/EBP δ の発現は観察されなかった。

上記の誘導剤を添加せず、10%CS(ウシ血清)存在下で培養した NIH-3T3 細胞は、3 時間の培養後、中程度の C/EBP β の発現が観察された (図 1 B、レーン 1)。プロラクチンを、用量を変化させて作用させると、濃度依存的な C/EBP β 転写産物の増加が認められた。プロラクチン濃度が 333ng/ml になると、C/EBP β の転写量は飽和に達した (図 1 B、レーン 4)。MIX は C/EBP β mRNA のレベルをプロラクチンと同程度に増加させた (レーン 6)。DEX やインスリンも、C/EBP β の転写を増強した (レーン 7 および 8)。FBS は、プロラクチンほどには C/EBP β mRNA の産生を誘導しなかった (レーン 9)。これらの結果から、プロラクチンは、少なくとも多能性間葉系幹細胞において、C/EBP β の転写を誘導することが判明した。

【実施例 2】プロラクチンは NIH-3T3 細胞および脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞において、PPAR γ の転写を誘導する

異所的に C/EBP β が発現する多能性間葉系幹細胞では、C/EBP β のレベルが一定の閾値を超えると PPAR γ の発現が活性化されることが知られている (Z. Wu et al. (1995) Genes Dev. 9: 2350-2363)。そこで、プロラクチンの投与が PPAR γ の発現を誘導するかを調べた。

10%ウシ血清、インスリン (10 μ g/ml)、DEX (1 μ M)、および MIX (0.5 mM) を含む DMEM 中に量を変化させながらプロラクチンを加え、コンフルエントになった細胞へ 48 時間作用させた。対照として、10%FBS、インスリン、DEX、および MIX を含む DMEM を、コンフルエントになった細胞へ同じ時間作用させた。PPAR γ mRNA の発現は MIX、DEX、およびインスリンの存在に依存する (Z. Wu et al. (1996) Mol Cell Biol. 16: 4128-4136) ため、これら 3 つの脂肪細胞分化誘導ホルモン (adipogenic hormones) の存在下で実験を行った。FBS にはプロラクチンが含まれる (R. Biswas and B.K. Vinderhaar (1987) Cancer Res. 47: 3509-3514) ため、そのプロラクチンの影響を除外するための対照として、10%CS 含有培地に上記 3 つの脂肪細胞分化誘導ホルモンを加えたものを使った実験も行った。

3T3-L1 細胞および NIH-3T3 細胞から全 RNA を単離し、PPAR γ cRNA(アンチセンス RNA)をプローブとして前述の C/EBP β の場合と同様にノーザンブロット解析を行った。図 2 にその結果を示す。その結果、PPAR γ mRNA はプロラクチンの濃度依存的に誘導されていることが判明した。2 日間培地にプロラクチンが存在しなかったにも関わらず、3T3-L1 細胞において低レベルの PPAR γ mRNA が観察された(図 2 A、レーン 1)。培地へプロラクチンを添加すると、PPAR γ mRNA 量はさらに増強された(レーン 2~5)。10%FBS を含む培地は、333ng/ml のプロラクチンを含む培地と同程度、PPAR γ mRNA を誘導した(レーン 4 と 6 を比較のこと)。NIH-3T3 細胞においても同様に、プロラクチンの用量依存的な PPAR γ mRNA の誘導が起こった(図 2 B、レーン 1~5)。しかしながら、プロラクチン非存在下では、PPAR γ mRNA は検出感度以下であった(レーン 1)。3T3-L1 細胞と同様に、10% FBS は 333ng/ml のプロラクチンと同様の PPAR γ mRNA の誘導能を示した(レーン 4 と 6 を比較のこと)。すなわち、これらの細胞株において、プロラクチンは PPAR γ mRNA を誘導することが判明した。

【実施例 3】 分化培地へのプロラクチンの添加は NIH-3T3 細胞の脂肪細胞分化プログラム (adipogenic program) を始動させる

上記実施例の結果から、プロラクチンを分化培地へ添加することにより、多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させることができる可能性が考えられた。そこで、NIH-3T3 細胞を用いて、全分化過程において通常の許容条件 (permissive conditions) で、プロラクチン存在下、分化試験を行った。

すなわち、コンフルエントに達した細胞を、10%FBS、1 μ M DEX、0.5mM MIX、および 10 μ g/ml インスリンを含む DMEM に培地を交換した(0 日目)。48 時間後、培地を 10%FBS、2.5 μ g/ml インスリンを含む DMEM に交換し、以後 1 日おきに培地を交換した。これを通常の許容培地とした。また、2 種類の培地にそれぞれ 1 μ g/ml のプロラクチンを加え、同様に培養した。

脂肪細胞の分化マーカー遺伝子である aP2 およびグリセロール-3-リン酸デヒ

ドロゲナーゼ (GPD) cRNA をプローブとして用いて、上記と同様の方法でノーザンブロット解析を行った。

その結果、これらの培地で 12 日間インキュベーションを行っても、ノーザン解析では aP2、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD) 等の分化マーカー遺伝子の発現は検出されなかった。さらに、細胞の形態変化や細胞内の脂肪滴形成も観察されなかった。これらの結果から、通常の許容培地にプロラクチンを加えるだけでは最終的な脂肪細胞分化遺伝子の発現を活性化させるには十分とはいえないことが示唆された。

3T3-L1 脂肪前駆細胞と異なり、通常の許容培地では、NIH-3T3 細胞は脂肪細胞へ変換しないことから、これらの細胞を脂肪細胞へと分化させる強い許容培地の使用を試みた。

チアゾリジンジオン (thiazolidinediones) として知られる化合物は PPAR γ の強力な活性化因子であり、脂肪細胞への分化を強く促進する (B.M. Forman et al. (1995) Cell 83: 803-812; J.M. Lehmann et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 12953-12956)。トログリタゾン (troglitazone) はこれらの化合物の一員であり、多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる能力を上昇させる (J.M. Lehmann et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 12953-12956)。この化合物を用いてさらに実験を行った。

まず、10%FBS、1 μ M DEX、0.5 mM MIX、および 10 μ g/ml インスリンを含む DMEM で細胞を 48 時間インキュベートし、その後インスリン (2.5 μ g/ml)、10%FBS と共に 5 μ M のトログリタゾンを含む DMEM (強い許容培地) と交換した。培地は一日おきに交換した。また、トログリタゾン添加前後の培地に 1 μ g/ml のプロラクチンを加え、同様に培養した。

図 3 は、上記のようにして行ったノーザンブロット解析による、分化誘導過程におけるさまざまな mRNA 発現の時間経過を示している。C/EBP β mRNA のレベルは 24 時間以内に最大に達し、48 時間までそれが維持された (図 3、レーン 2~3)。

3日後、発現レベルは徐々に低下した(図3、レーン4~7)。これらの性質は3T3-L1細胞で観察されたもの(Z. Cao et al. (1991) Genes Dev. 5: 1538-1552)と一致していた。2日目までは、C/EBP β mRNAレベルのプロラクチン依存的な変化は観察されなかった(レーン2~3および8~9を比較のこと)。しかし3日目以降は、プロラクチンが存在すると、C/EBP β mRNAはいくらか高いレベルに維持されることが判明した(レーン4~7および10~13を比較のこと)。

また、C/EBP δ cRNAをプローブとして上記と同様にノーザンブロット解析を行った結果、C/EBP δ mRNAのレベルも脂肪細胞への分化誘導と共に高まり、2日間高いレベルに維持された(図3、レーン2~3)。しかし3日目には、C/EBP δ mRNA量は急速に低下し、その後はほとんど検出されなかった。これは、3T3-L1細胞で観察された結果と対照的である。3T3-L1細胞では、C/EBP δ mRNAは4日間高いレベルに維持され、その後次第に低下して行く(Z. Cao et al. (1991) Genes Dev. 5: 1538-1552)。プロラクチンの有無によるC/EBP δ mRNAレベルの明白な違いは検出されなかった(図3、レーン2~3および8~13を比較のこと)。

3T3-L1細胞においては、PPAR γ mRNAレベルは細胞の分化により上昇することが知られている(Tontonoz, 1994 Cell 79 1147-1156)。NIH-3T3細胞で、同様のことが起こるかどうかを調べた。PPAR γ mRNA量は、MIX、DEX、およびインスリンによるインキュベーション2日目以降上昇し、プロラクチン非存在下ではその後急速に減少した(レーン1~7)。それに対して、プロラクチンを培地に加えた場合、転写産物のレベルは3T3-L1細胞と比べるとかなり低い、2日目のPPAR γ mRNAの発現は劇的に増加し、10日目まで観察された(レーン3、9、8~13)。

プロラクチンによりC/EBP β が誘導されたことから、C/EBPファミリーに属するもう一つの転写因子であるC/EBP α mRNAのプロラクチンの影響を調べた。C/EBP α cRNA(アンチセンスRNA)をプローブに用いて、上記と同様にノーザンブロット解析を行った結果、前記と同様の条件において、C/EBP α mRNAは検出されなかった。このことは、C/EBP β mRNAを異所的に発現する多能性間葉系幹細胞におけ

る観察と一致する (Z. Wu et al. (1995) Genes Dev. 9: 2350-2363)。

GPD および aP2 遺伝子のノーザンブロット解析の結果、プロラクチンを含む培地にTROグリタゾンを加えると、これら2つの遺伝子の発現を誘導することが判明した (図3)。プロラクチン非存在下でも、aP2 mRNA は3日目から10日目まで観察された (レーン 4~7)。これらの強い許容培地にプロラクチンを加えることによって、aP2 遺伝子の発現は増強された (図3、レーン 4~7 および 10~13 を比較のこと)。GPD 遺伝子に対するプロラクチンの効果はより一層重大であった。プロラクチン非存在下では、GPD mRNA は検出されなかった。しかしプロラクチン存在下では、GPD mRNA は8日目に出現し、10日目までその量は増加した (図3、レーン 12 および 13)。分化誘導8日後には一部の細胞がプロラクチンおよびTROグリタゾン存在下において丸みを帯び、脂肪滴を蓄積しているのが観察されたがその量は少なかった。

【実施例4】 プロラクチン受容体を異所的に発現する NIH-3T3 細胞の脂肪細胞分化プログラムにおけるプロラクチンの効果

4-1)

プロラクチン受容体が NIH-3T3 細胞を脂肪細胞へ変換する能力があるのかを調べた。ラットプロラクチン受容体遺伝子 (PR) (Shirota M et al., 1990, Mol. Endocrinol., 4, 1136-1143; スイス、バーゼル フリードリッヒミーシャー研究所の Dr. Roland Ball より供与) を pME18S (Mol. Cell. Biol. 8:466~472(1988)) へ組み込み、ネオマイシン耐性遺伝子をコードする pSV2neo (Clontech) と共に「lipofectAMINE PLUS (GIBCO BRL)」を用いて添付の説明書に従い NIH-3T3 細胞へ安定にトランスフェクトした。具体的には PR を含むプラスミド 8 μ g と pSV2neo 0.4 μ g を 20 μ l の PLUS 試薬 (GIBCO BRL) と 30 μ l の lipofectAMINE (GIBCO BRL) と共に、1.5ml の OPTI-MEM I (GIBCO BRL) 中で室温で 30 分間インキュベートした後、8ml の OPTI-MEM I を加えた。1 日前に 10cm ディッシュに 8×10^5 細胞の密度でまいた細胞を OPTI-MEM I で洗浄し、DNA を含む先の混合液を加えた。3 時間

37°Cでインキュベートした後、10%正常ウシ血清を含む DMEM で 24 時間培養し、その後 0.4mg/ml の G418 で選択した。対照として、ネオマイシン耐性遺伝子 (pSV2neo)のみを導入した細胞も選択した。トランスフェクタントは 14 日間 G418 存在下で選択し、耐性クローンをコロニー形成させた。G418 耐性コロニーを各々ほぼ同数 (60~70/ディッシュ) 含むディッシュを 1 μ g/ml のプロラクチンを含む前述の高許容条件に暴露させ、10 日間 *in situ* で分化させた。具体的には、まず、10%FBS、1 μ M DEX、0.5 mM MIX、10 μ g/ml インスリン、および 1 μ g/ml のプロラクチンを含む DMEM で細胞を 48 時間インキュベートし、ついでインスリン (2.5 μ g/ml)、10%FBS、5 μ M のトログリタゾン、および 1 μ g/ml のプロラクチンを含む DMEM (強い許容培地) と交換し、8 日間 *in situ* で分化させた。培地は一日おきに交換した。

その後コロニーを、2%ホルムアルデヒドおよび 0.2%グルタルアルデヒドを含む PBS で固定し、Oil-Red-O で染色して脂肪細胞への変換 (細胞質中の脂肪滴の蓄積) を観察した (A. Preece (1972) "Manual for histologic technicians", Boston, MA.: Little, Brown, and Co.)。ホルモンによる刺激の前には、脂肪滴を含有する分化した細胞は観察されなかった。しかし、前述の強い許容培地で 10 日間インキュベートすると、プロラクチン受容体をトランスフェクトしたプレート上に、いくつかの最終分化した脂肪細胞のコロニー (丸みをおびた細胞集団) が出現していることが、Oil-Red-O 染色により確認された (コロニー中 50%以上の細胞が染色されている場合、分化したコロニーとした)。なお、形態変化を供なわない、すなわち繊維状の細胞集団は Oil-Red-O では決して染色されなかった。

同様の実験は 3 回繰り返した。これらの培地の条件においては、プロラクチン受容体遺伝子をコトランスフェクトした G-418 耐性コロニーの約 11%が、最終分化した脂肪細胞となった。ネオマイシン耐性遺伝子のみをトランスフェクトした対照細胞では、分化したコロニーは約 2%であった。これらの結果を表 1 にまとめた。表中、全コロニー数は、3回の独立したトランスフェクション実験で観察

された G418 耐性コロニー数の合計である。また、分化コロニー数は、Oil-Red-O で 50%以上が染色されたコロニー数である。このとき、脂肪細胞が散在するいくつかのコロニーがあったが、Oil-Red-O 染色により弱くしか染色されなかったため、分化コロニー数のスコアから除外した。

表 1

in situ コロニー分化アッセイ			
発現プラスミド	全コロニー数	分化コロニー数	比率(%)
pSV2neo	232	5	2.1
PR+pSV2neo	213	24	11.3

これらのデータから、プロラクチン受容体は脂肪細胞への分化に重要な役割を果たしていることが確認された。

4-2)

脂肪細胞分化の実験においては細胞クローン間の分化能の差異が非常に大きい
ため次に細胞を集団で扱いこれらの問題を排除した。

プロラクチン受容体を異所的に発現する安定したトランスフェクタントを G-418 選択により単離し、20,000 以上のクローンを集めた。親細胞ではプロラクチンにより C/EBP β および PPAR γ mRNA が誘導されたことから、これらの遺伝子発現のプロラクチン用量依存性を上記の細胞で調べた。

コンフルエントに達した細胞を 10%ウシ血清 (CS) を含む DMEM にプロラクチンを、用量を増やしながら加え、3 時間培養した。全 RNA を単離し、ノーザンブロット解析により C/EBP β mRNA を解析した。

ネオマイシン耐性遺伝子のみをトランスフェクトした対照細胞では、親細胞と

同様の、用量依存的な C/EBP β mRNA の発現が観察された (図 1 および図 4 A、レーン 1~5)。プロラクチン受容体発現細胞群では、プロラクチンへの感受性がより高まった (図 4 A、レーン 6~10)。

次に、PPAR γ mRNA に及ぼすプロラクチンの影響も調べた。10%ウシ血清(CS)、10 μ g/ml インスリン、1 μ M DEX、および 0.5 mM MIX を含む DMEM にプロラクチンを、用量を増やしながら細胞に加え、48 時間培養した。図 4 B はそのときの対照細胞およびプロラクチン受容体発現細胞から RNA を調製し、ノーザンブロット解析を行った結果である。対照細胞群では、親細胞と同様のプロラクチン量依存的な PPAR γ mRNA の発現が観察された (図 2 B および図 4 B、レーン 1~5)。これらにプロラクチン受容体を異所的に発現させた細胞群では、PPAR γ mRNA 発現に対するプロラクチンの感受性が非常に高まった (レーン 1~5 および 6~10 を比較のこと)。

プロラクチン受容体の異所的な強発現が PPAR γ mRNA および C/EBP β mRNA の発現誘導を促進することから、プロラクチン受容体発現細胞群および対照細胞群でプロラクチンの存在下/非存在下における分化過程を解析した。具体的には、まず、10%FBS、1 μ M DEX、0.5 mM MIX、および 10 μ g/ml インスリンを含む DMEM に培地を交換 (0 日目) し、48 時間インキュベートした後、インスリン (2.5 μ g/ml)、10%FBS と共に 5 μ M のトログリタゾンを含む DMEM (強い許容培地) と交換した。培地は一日おきに交換した。また、トログリタゾン添加前後の培地に 1 μ g/ml のプロラクチンを加え、同様に培養した。

これらトランスフェクタントの全分化プログラムを下記の脂肪細胞特異的マーカー遺伝子のノーザンブロット解析により調べた (図 5)。対照細胞においてはプロラクチン存在下において、3 日後に C/EBP β mRNA 発現は、親細胞の場合 (図 3) と同様に、わずかに上昇した (図 5 A)。プロラクチン受容体発現細胞群では、プロラクチン存在下において、特に 3 日目に C/EBP β mRNA の上昇が観察され (図 5 A、レーン 4、9、および図 5 B のそれらを比較のこと)、その後わずかに高い発現

レベルが保たれた。C/EBP δ mRNA については、全分化過程において、両細胞群ともプロラクチン添加の明確な効果は観察されなかった。対照細胞群では、プロラクチン非存在下で、PPAR γ mRNA 発現は 2 日目にピークとなり、その後急速に低下した (レーン 1~6)。プロラクチン受容体を異所的に強発現させると PPAR γ の発現は増強された。プロラクチンにより、特にプロラクチン受容体発現細胞群では、分化プログラムの後期においてこの発現は比較的高く維持された (パネル A および B、レーン 9~11)。aP2 mRNA は両細胞群において、3 日目には検出された (レーン 4)。プロラクチンの添加により aP2 mRNA 発現は強く活性化された (パネル A および B、レーン 9~11 を比較のこと)。プロラクチン受容体発現細胞群においては、プロラクチンの添加により aP2 mRNA の発現はさらに強く活性化された。プロラクチン非存在下では、対照細胞群において 8 日後でも GPD mRNA はほとんど検出されなかった (パネル A、レーン 6) が、プロラクチン存在下で 8 日目にその転写が上昇した (レーン 11)。同様に、プロラクチン受容体発現細胞群においては、プロラクチン非存在下では GPD mRNA は検出されなかった (パネル B、レーン 1~6) が、プロラクチンの添加により GPD mRNA 誘導が増強され、5 日目には GPD mRNA が検出され、8 日目には更に増加した (図 5 B、レーン 10 および 11)。他の脂肪細胞分化関連マーカー遺伝子である C/EBP α の発現は 8 日間の培養期間中検出されなかった。

次ぎに細胞の分化を顕微鏡で観察した。「4-1」と同様に脂肪細胞誘導培地で 10 日間培養後、プロラクチン受容体発現細胞群および対照細胞群を Oil-Red-O で染色したところ、ネオマイシン耐性遺伝子のみを導入した対照細胞では (プロラクチン非存在下において)ほとんど脂肪細胞への変換が起きていなかった (1% 以下、図 6、Neo および表 2)。これらの細胞にプロラクチンを添加すると丸みを帯びた細胞数が増えた。染色の結果、4%の細胞が分化したと判断した (図 6、Neo+prolactin、表 2)。一方、プロラクチン受容体を発現する細胞を同様の手順で分化誘導させると、プロラクチン存在下約 18%の細胞が脂肪細胞への変換を起

こし、脂肪滴を蓄積した（図 6、Neo+PR+prolactin および表 2）。またこの細胞群でもプロラクチン非存在下では分化率の低下がみられた（5%、図 6、Neo+PR、表 2）。このことは NIH-3T3 細胞の脂肪細胞への効率的な分化のためにはプロラクチン受容体の高発現ばかりではなくその活性化が必要であることを示している。これらの安定なトランスフェクション実験を 4 回繰り返した結果、プロラクチン受容体遺伝子をコトランスフェクションした G-418 耐性細胞の 13~23%が脂肪を蓄積した脂肪細胞へ変換した。結果を表 2 に示す。表中、分化した比率は、4 回の独立した各トランスフェクション実験において、ランダムな 10 箇所の視野中の 200 細胞について計数した結果（平均±標準偏差）を表す。

表 2

プールしたクローンの分化アッセイ	
発現プラスミド	分化した比率(%)
pSV2neo	<1
pSV2neo+prolactin	4±1
PR+pSV2neo	5±2
PR+pSV2neo+prolactin	18±5

以上の結果を総合すると、プロラクチン受容体は多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への変換に重要な役割を果たしていることが実証された。

産業上の利用の可能性

本発明により、プロラクチンおよび PPAR γ によるシグナルが協調して、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導していることが明らかとなった。この脂

肪細胞の分化系を利用して、また脂肪細胞分化のシグナルの伝達に関連する因子を標的として、脂肪細胞への分化を促進または阻害する化合物のスクリーニングを行うことが可能となった。スクリーニングにより得られる化合物は、インシュリン抵抗性糖尿病など、脂肪細胞分化が関与する疾患の予防や治療のための薬剤としての利用が期待される。

また、PPAR γ のアゴニストは、単球の炎症性サイトカイン産生を抑制することから (C. Jiang et al. (1988) Nature 39 : 82-86)、PPAR γ mRNA 量を増やすプロラクチンおよびそのアゴニストは、PPAR γ アゴニストと共に慢性関節リウマチの治療薬として働く可能性がある。

請求の範囲

1. 多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる方法であって、プロラクチンまたはその同効物の共存下で多能性間葉系幹細胞を培養する工程を含む方法。
2. さらに、PPAR γ 活性化剤が共存している、請求項 1 に記載の方法。
3. 多能性間葉系幹細胞が外来性のプロラクチン受容体を発現している、請求項 1 または 2 に記載の方法。
4. 多能性間葉系幹細胞が NIH-3T3 細胞である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。
5. 脂肪細胞の分化阻害剤または促進剤をスクリーニングする方法であって、
 - (a) 被検試料、およびプロラクチンまたはその同効物の共存下、多能性間葉系幹細胞を培養する工程、
 - (b) 該細胞の脂肪細胞への分化を検出する工程、および
 - (c) 被検試料非共存下（対照）における場合と比べ、該変化を阻害または促進する化合物を選択する工程、を含む方法。
6. さらに、PPAR γ 活性化剤が共存している、請求項 5 に記載の方法。
7. 多能性間葉系幹細胞が外来性のプロラクチン受容体を発現している、請求項 5 または 6 に記載の方法。
8. 脂肪細胞への分化を、細胞質中の脂肪の蓄積、脂肪細胞への分化を誘導する遺伝子の発現、または脂肪細胞のマーカー遺伝子の発現を指標として検出する、請求項 5 から 7 のいずれかに記載の方法。
9. 多能性間葉系幹細胞が NIH-3T3 細胞である、請求項 5 ～ 8 のいずれかに記載の方法。
10. 脂肪細胞への分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、
 - (a) プロラクチンと被検試料とを接触させる工程、および

(b) プロラクチンに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

11. 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) プロラクチン受容体と被検試料とを接触させる工程、および

(b) プロラクチン受容体に結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

12. 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下でプロラクチンとプロラクチン受容体とを接触させる工程、および

(b) プロラクチンとプロラクチン受容体との結合を阻害または促進する化合物を選択する工程、を含む方法。

13. 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) 内在性プロラクチン受容体を発現する細胞であって、かつプロラクチンに応答して活性化するプロモーターおよびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞を提供する工程、

(b) 該細胞に対し、被検試料、または被検試料およびプロラクチンを接触させる工程、および

(c) 該細胞におけるレポーター活性を検出する工程、を含む方法。

14. プロラクチン阻害剤を有効成分とする、脂肪細胞分化阻害剤。

15. プロラクチン受容体阻害剤を有効成分とする、脂肪細胞分化阻害剤。

16. プロラクチン活性化剤を有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤。

17. プロラクチン受容体活性化剤を有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤。

18. 請求項5から13のいずれかに記載の方法により単離しうる、脂肪細胞分化阻害剤または脂肪細胞分化促進剤。

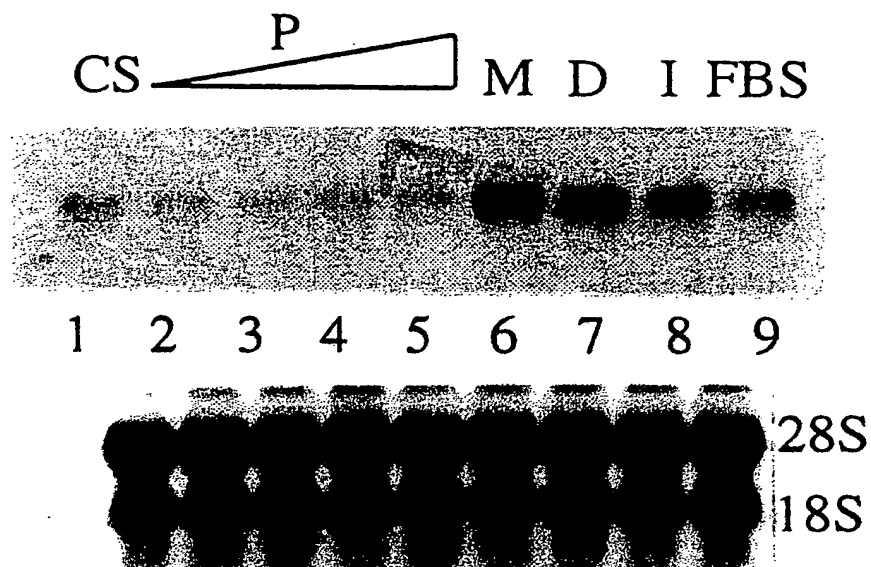
19. プロラクチンを有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤。

- 20. プロラクチンを有効成分とする、PPAR γ の発現誘導剤。
- 21. プロラクチンを有効成分とする、C/EBP β の発現誘導剤。
- 22. プロラクチンの細胞内シグナル伝達を阻害もしくは亢進する化合物であって、脂肪細胞分化を阻害または促進する化合物。

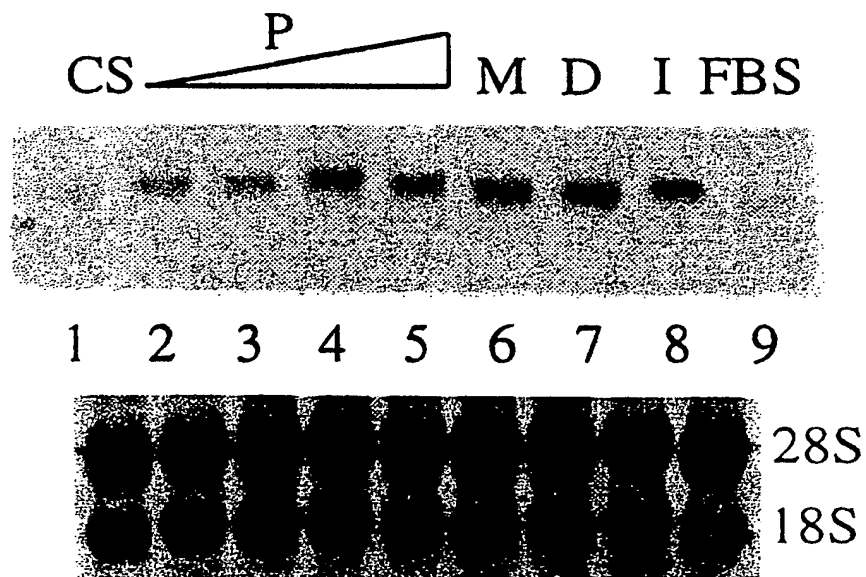
1/6

☒ 1

A. 3T3-L1



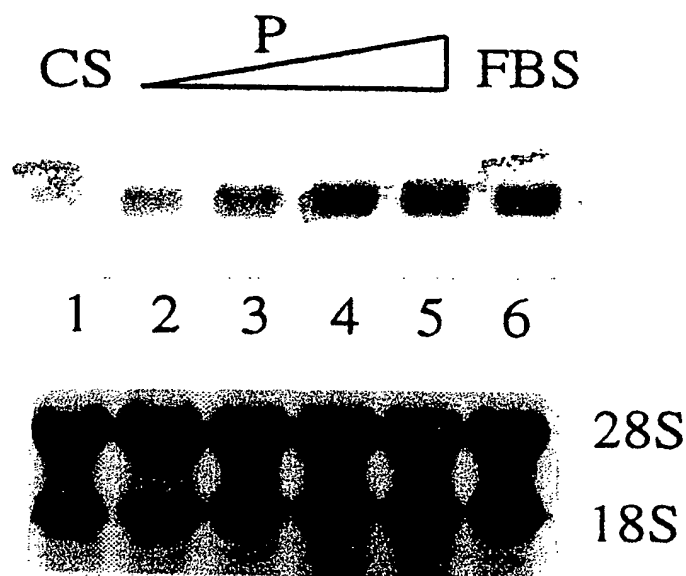
B. NIH 3T3



2 / 6

図 2

A. 3T3-L1



B. NIH 3T3

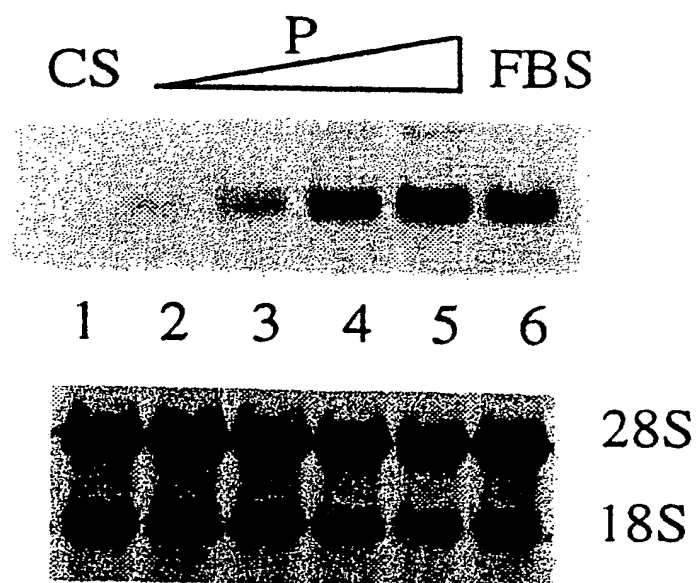
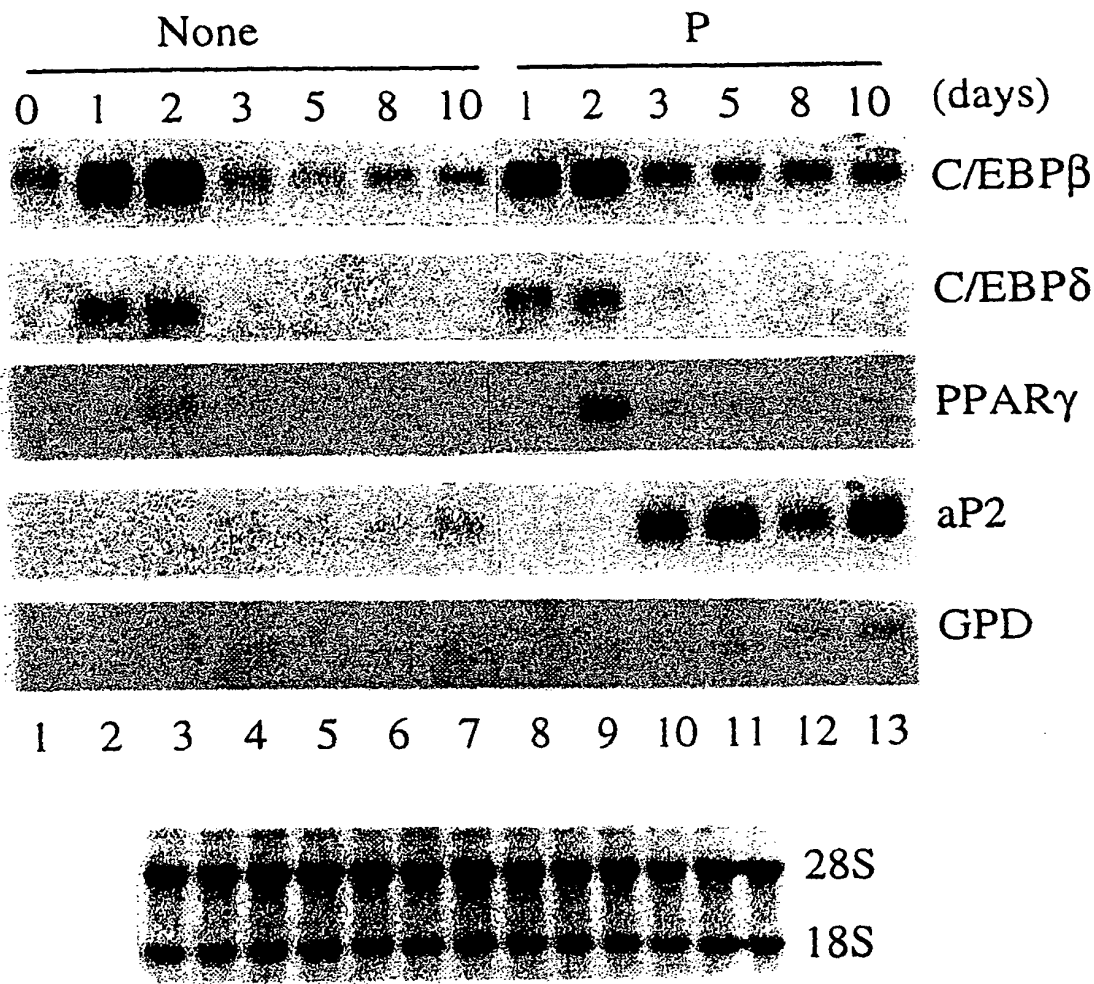


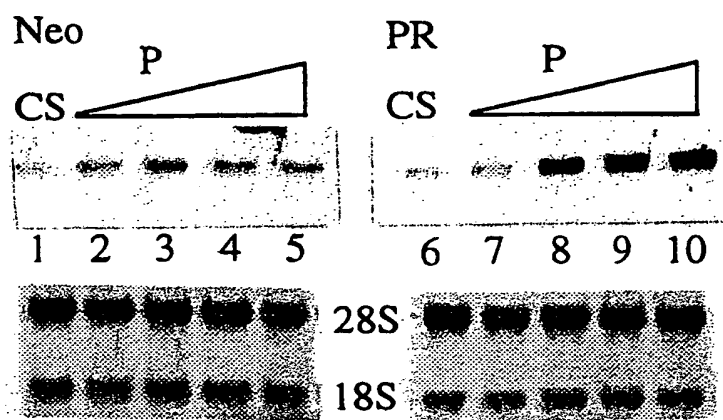
図 3



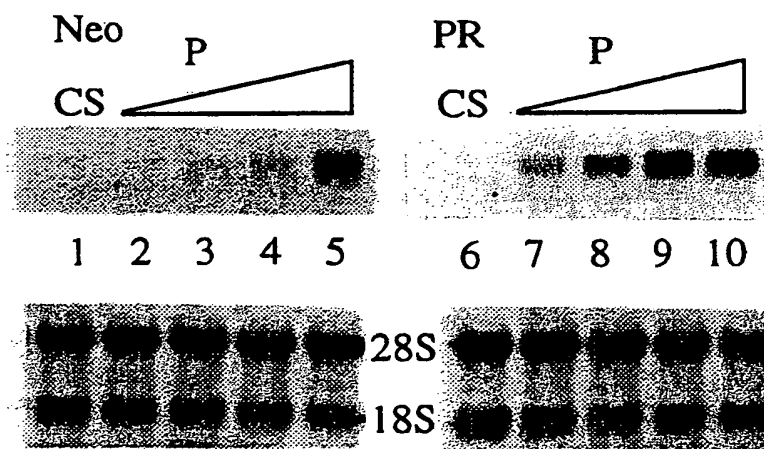
4 / 6

☒ 4

A.



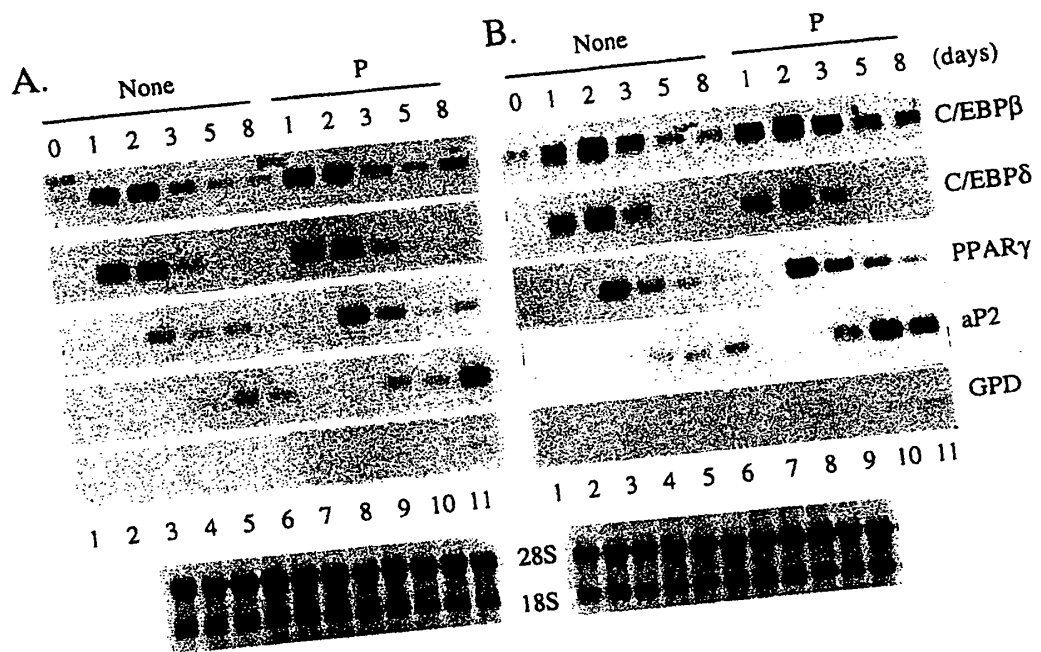
B.



WO 00/46348

5/6

图 5



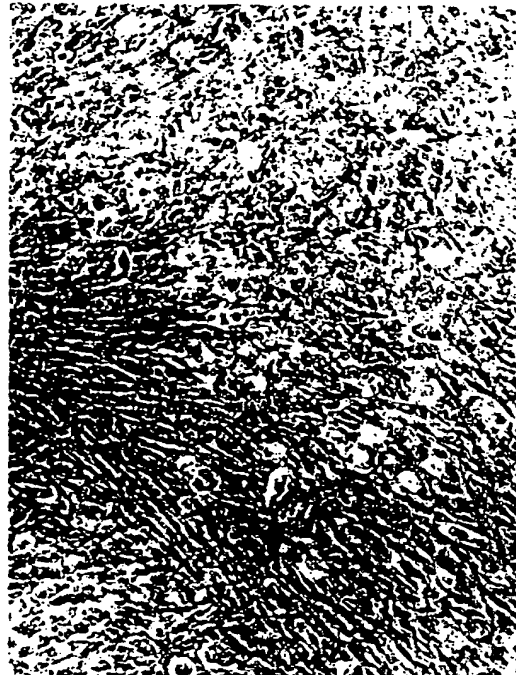
6 / 6

図 6

Neo



Neo + prolactin



Neo + PR



Neo + PR + prolactin





配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

<120> Methods for inducing adipocyte differentiation,
and chemicals which control adipocyte
differentiation and methods for screening them.

<130> H1-007PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-24625

<151> 1999-02-02

<160> 6

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 1

atggagtcgg ccgacttcta cgaggcggag

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 2

atgcaccgcc tgctggcctg ggacgcagca

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 3

atgagcgccg cgcttttcag cctggacagc

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 4

atggttgaca cagagatgcc attctggccc

30

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 5

atgtgtgatg cctttgtggg aacctggaag

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 6

atggcgtttc aaaaggcagt gaaggggact

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00567

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/00, C12N15/11, A61K38/22, A61K43/00, A61K45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/00, C12N15/11, A61K38/22, A61K43/00, A61K45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Connie A. Myers et al., "Characterization of BCE-1, a transcriptional enhancer regulated by prolactin and extracellular matrix and modulated by the state of histone acetylation", Molecular and Cellular Biology (1998), Vol.18, No.4, P.2184-2195	1-22
Y	Zhang-Zhi Hu et al., "Transcriptional regulation of the generic promoter III of the rat prolactin receptor gene by C/EBP β and Spl", The Journal of Biological Chemistry (1998), Vol.273, No.40, p.26225-26235	1-22
Y	Peter M. Spooner et al., "Development of lipoprotein lipase activity and accumulation of triacylglycerol in differentiating 3T3-L1 adipocytes", The Journal of Biological Chemistry (1979), Vol.254, No.4, p.1305-1311	1-22
Y	Lehmann, J.M. et al., "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)", The Journal of Biomedical Science (1995), Vol.270, No.22, p.12953-12956	1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 April, 2000 (10.04.00)

Date of mailing of the international search report
18 April, 2000 (18.04.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00567

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Zhidan Wu et al., "Conditional ectopic expression of C/EBP β in NIH-3T3 cells induces PPAR γ and stimulates adipogenesis", Genes & Development (1995), Vol.9, p.2350-2363	1-22